p. omaggio

Laboratorio Batteriologico e Medico-micrografico della Sanità publica
diretto dal prof. GOSIO

Im 17

AZIONE DEI GELI E DISGELI ALTERNATI

SULLA VITALITA' E VIRULENZA

DI ALCUNI GERMI PATOGENI

NOTA

del Dott. FRANCESCO TESTI
Capitano medico

Estratto dalla **Riforma Medica** *N. 266*
Anno XVIII

ROMA
TIPOGRAFIA DI F. FAILLI
Via della Consolazione, 64
1902

Laboratorio Batteriologico e Medico-micrografico della Sanità pubblica
diretto dal prof. GOSIO

AZIONE DEI GELI E DISGELI ALTERNATI

SULLA VITALITA' E VIRULENZA

DI ALCUNI GERMI PATOGENI

NOTA

del Dott. FRANCESCO TESTI
Capitano medico

Estratto dalla **Riforma Medica** *N. 266*
Anno XVIII

ROMA
TIPOGRAFIA DI F. FAILLI
Via della Consolazione, 64
1902

È noto da tempo che la maggior parte dei batteri presentano una straordinaria resistenza al freddo. Pasteur dapprima nelle sue classiche ricerche sulla generazione spontanea (1), più tardi Von Friesch (2) che fece il primo studio sistematico circa all'influenza delle basse temperature sulla vita dei batteri, lo constatarono. Numerose e più recenti ricerche, in alcune delle quali si impiegarono temperature bassissime, perfino di — 200°, ed alle quali vanno specialmente legati i nomi di Pictet e Yung (3), D'Arsonval e Charrin (4), diedero al fatto la più ampia conferma.

Le suddette ricerche però, certamente importantissime dal lato scientifico, andarono molto al di là delle condizioni naturali di vita dei batteri e perciò altri osservatori più praticamente limitarono le loro esperienze, usando temperature di 0°, o di poco inferiori, e studiando specialmente il limite della resistenza vitale dei germi in rapporto alla durata d'azione di questa temperatura, come fecero Mitchell (5), Fraenkel (6), e Prudden (7), ed il modo di comportarsi della virulenza come fece Klepzow (8) pel bacillo del carbonchio. E non solo la prolungata azione della temperatura a 0°, ma anche le alternative di alte e basse temperature, e precisamente del gelo e disgelo sui liquidi contenenti microrganismi patogeni furono oggetto di speciali ricerche.

Finalmente, per esaurire l'enumerazione degli studi sull'argomento, sono da citarsi le speciali ricerche fatte sui più

importanti dei microrganismi patogeni dal lato pratico, e cioè sul colera e sul tifo, e particolarmente quelle di Weiss (9), Raptschewski (10), Uffelmann (11), Karschinski (12), Wuchnow (13), Abel (14), Renk (15), Kasanski (16), Macfadyen (17) relativamente al colera, e quelle di Billings (18), Bashenow (19), Montefusco (20), Prudden, Janowski (21), Park (22), Sedgwick e Winslow (23), Brehme (24) circa al bacillo del tifo.

*
* *

Avendo in parecchie circostanze avuto occasione di ripetere alcune esperienze sull'azione dei geli e disgeli verso i batteri, e parendomi non bene assodata la questione su questo punto, questione che del resto, come avviene di tutte le esperienze sui mezzi battericidi, fisici o chimici che siano, avrà sempre a suo carico delle incertezze in quanto ai risultati finali, sia pel fatto della scelta dei germi, sia per le condizioni speciali di loro resistenza individuale, sia per le condizioni varie d'esperimento dovute alla quantità dei germi, al liquido in cui sono immersi, al modo di aggregazione loro ecc. parvemi opportuno riprendere la questione stessa, cercando però di indirizzare le ricerche ad uno scopo pratico. E tanto più mi parve utile questo studio inquantochè le conclusioni degli autori non sono in perfetto accordo. Mentre ad esempio Prudden e Park dichiarano che i geli e i disgeli successivi riescono ad uccidere i bacilli del tifo, Sedgwick e Winslow ritengono questo trattamento poco efficace; il, Brehme, poi, l'ultimo degli sperimentatori sul proposito, trovò i bacilli del colera ancora viventi dopo 40 geli e disgeli successivi nello spazio di 32 ore, e dei bacilli del tifo sottoposti al medesimo trattamento, alcuni trovò ancora viventi, altri no. In quanto poi allo scopo delle mie ricerche, io ebbi di mira, controllando questi risultati con alcuni bacilli patogeni, di vedere se, ottenendo con geli e disgeli alternati la morte dei germi, si poteva avere, per la produzione dei vaccini, nel più ampio senso della parola, un mezzo il quale fosse dotato di un'azione meno distruttiva sulla cellula batterica, permettendo così un facile controllo sulla purezza o meno dei prodotti.

In altri termini, cercai di studiare l'azione alternata di

gelo e disgelo su alcuni germi patogeni, avendo di mira: 1° la resistenza al trattamento; 2° le possibili variazioni morfologiche in seguito a tale trattamento; 3° le eventuali modificazioni della virulenza, dato che non ne venisse [distrutta la vitalità. E siccome per la pratica si sarebbe reso troppo incomodo il trattamento continuato per molte ore o giorni, limitai le prove a 12 ore, ottenendo, di mezz'ora in mezz'ora geli e disgeli alternati fino al numero di 12 per ciascuno, agendo però fra limiti di temperatura molto più estesi di quelli usati dai precedenti autori. Inoltre, avendo colle esperienze preliminari constatato che la resistenza dei germi a queste temperature alterne è molto maggiore quando essi vi sono sottoposti entro i loro stessi brodi di cultura, di quello che quando le patine delle culture in agar sono sospese nell'acqua semplice, così mi attenni a quest'ultimo procedimento.

*
* *

I germi scelti per tale studio furono i seguenti: 1° Colera isolato di recente da un caso di colera dell'attuale epidemia egiziana, con caratteri morfologici ben netti, dotato di molta mobilità, assai patogeno per le cavie; 2° Colera dei polli — da cultura di laboratorio, reso assai virulento con successivi passaggi in galline ed in giovani passeri; 3° Tifo — da cultura di laboratorio, reso virulento col metodo Sanarelli, assai mobile, morfologicamente e culturalmente caratteristico; 4° Difterite — da cultura tipica di Kruse, resa virulentissima con successivi passaggi nelle cavie; 5° Morva — da cultura virulentissima isolata di recente da un cavallo infetto.

La metodica per le ricerche fu la seguente: Preparai dapprima le culture fresche in agar di ciascuno dei suddetti germi; poi prelevate, coll'ago di platino, due anse per ciascuna cultura, allestii delle sospensioni batteriche in tubi contenenti ciascuno 8 cc. di acqua distillata sterilizzata, procurando coll'agitazione e coll'ago di platino che le dette sospensioni fossero il più possibilmente omogenee.

Introducevo poi subito i tubi così preparati e che proteggevo con un cappelletto di gomma per impedire che eventualmente potesse bagnarsi il cotone, in un recipiente contenente la miscela frigorifera composta di 3 parti di neve ed 1 di sal da cucina, assicurandomi anche con adatto termometro della temperatura raggiunta dalla miscela. In media ebbi tem-

perature di — 20° sotto zero. Avendo constatato che entro una mezz'ora le sospensioni batteriche erano completamente gelate, disposi gli esperimenti in modo che di mezz'ora in mezz'ora si avessero i geli e i disgeli, i quali ultimi erano ottenuti immergendo, appena estratti dalla miscela frigorifera, i tubi in un bagnomaria a temperatura costante di + 37°. Per tal modo potei ottenere alternativamente e di continuo 12 geli e 12 disgeli, con temparature estreme di — 20° e + 37°. Dopo l'ultimo disgelo, lasciavo i tubi in termostato ed il mattino seguente esaminavo al microscopio i batteri così trattati, facevo colture in brodo seminando abbondantemente la sospensione batterica, ed in caso di sviluppo, ricercavo la virulenza del bacillo colla inoculazione negli animali recettivi. Aggiungerò ancora che per ogni germe sviluppato in coltura, ripetei l'esame microscopico e che in qualche caso feci anche colture in piastre su gelatina prima e dopo il trattamento della sospensione batterica, per avere qualche indizio sul numero dei germi dopo il trattamento stesso.

*
* *

Le esperienze furono numerose. Credo però non sia il caso di passarle in minuziosa rassegna, e vengo subito a parlare dei risultati i quali furono i seguenti:

1.° L'esame microscopico dei batteri sottoposti a queste alternative di temperatura, mi diede, in goccia pendente, una diminuzione assai marcata della mobilità pel bacillo del tifo e pel vibrione colerico, nei preparati colorati, una trasformazione dei vibrioni colerici in forme tondeggianti, a guisa di cocchi, però di varia dimensione, qualche volta unite a due a due, raramente in forma di coccobacilli; uno stato plasmolitico piuttosto accentuato nei bacilli del tifo, della morva e della difterite; nessuna modificazione morfologica nei batteri del colera dei polli. L'esame microscopico delle colture sviluppatesi in seguito ad insemenzamento nei comuni mezzi nutritivi, non rivelò alcuna modificazione, essendo ritornati i caratteri morfologici dei singoli batteri nelle loro rispettive condizioni normali.

2.° Lo sviluppo colturale, dopo i dodici passaggi dal gelo al disgelo, si ebbe per tutti i germi, tranne in due casi pel colera dei polli, il quale mostrò anche un ritardo spesso assai notevole (6 o 7 giorni) nello sviluppo delle colture. Qualche

ritardo (3 o 4 giorni) si ebbe pure nello sviluppo colturale della morva e della difterite. Il colera ed il tifo invece si svilupparono sempre entro le 24 ore, in agar, con abbondante patina.

3.° In genere il numero dei germi dopo il trattamento si mostrò poco variabile da quello che si riscontrò prima del trattamento stesso; però nel colera dei polli più di frequente, nella morva e nella difterite più di rado, si ebbe una sensibile diminuzione, molte volte corrispondentemente al ritardo nello sviluppo della coltura.

4.° In tutti i casi nei quali, avvenuto lo sviluppo della coltura, fu praticata l'esperienza biologica sugli animali, si ebbe sempre la morte dei medesimi, nelle medesime condizioni, colle medesime note anatomo-patologiche, coi medesimi reperti batteriologici, e nel medesimo tempo come negli esperimenti praticati coi germi non sottoposti a questo trattamento. Solo le colture del colera dei polli nei tre casi nei quali furono praticate le inoculazioni sperimentali, non provocarono alcun accidente patogeno negli animali da esperimento.

*
* *

È lecito da questi risultati trarre delle conclusioni? Se fosse sempre costante quanto ho osservato circa al colera dei polli, potrebbesi pensare alla possibilità di un nuovo modo di attenuazione della sua virulenza, con qualche pratica applicazione nel campo della profilassi verso quell'epizoozia. Non azzardo però fare delle proposte, dato il numero alquanto ristretto delle esperienze, contentandomi per ora di citar il fatto che potrà del resto avere la ragione, o meno, della sua costanza, con nuovi e più estesi studii. Non debbo però tralasciare di citare a questo proposito una vecchia osservazione di Gibier (25) che prova la poca resistenza del germe in parola al freddo, giacchè, secondo il detto autore, una temperatura di - 35° lo ucciderebbe sempre.

In quanto agli altri germi, resta sempre dimostrato che come sono resistenti alle basse temperature, lo sono pure alle loro alternative. Se nelle esperienze di alcuni autori, come in quelle del Brehme, si è trovato che qualche volta il bacillo del tifo non può resistere, credo che ciò debbasi attribuire all'eccessivo ripetersi delle alternative stesse (il Brehme ne ha esperimentate 40). Ma in questo caso trattasi di condizioni

artificialmente esagerate, nè per lo scopo che mi era prefisso e che ho accennato in principio di questa nota, credo che si possa pretendere una maggiore applicazione di un trattamento che per 12 ore non interrotte mi tenne occupato fra le pareti del laboratorio.

BIBLIOGRAFIA.

(1) Pasteur. Expèriences relatives à la génération spontanée Parigi 186'. — (2) von Friesch. Ueber den Einfluss niederen Temperaturen auf die Lebensfätigkeit der Bakterien. Zeitzungsberichte der Wiener Acad. der Wissenschaft. Maggio 1877. — (3) Pictet e Young. De l'action du froid sur le microbes. Compt. rend. de l'acad. des Sciences, 1884 XCVIII. — Pictet. De basses températures en biologie. Archiv des sciences phys. et nat. de Genève, 1893. — (4) D'Arsonval e Charrin. Influences des agents sur l'évolution de la cellule bactérienne. Archives de physiologie, 1894. --- (5) Mitchell. The medical Records, 1887. --- (6) Fraenkel. Ueber die Bakteriengehalt der Eises. Zeitschr. f. Hyg. I, 2.a parte. --- (7) Prudden. Sur les Bacteries de la glace-New-York Medical Record, 1887. --(8) Klepzow Zur Fräge ueber der Einfluss niederen Temperaturen auf die vegetativen Formen der B. Antracis. Centralbl. f. Bakter., XVI', 1895. --- (9) Weiss. Ueber das Verhalten der Cholera-Erreger bei niede rigen Temperaturen. Zeitschr. f. Hygiene XVII'. --- (10) Raptschewski. Wratsch 1886, cit. da Kasanski. -- (11) Uffelmann. Weitere Beiträge zur Biologie des Cholerabacillus. Einfluss der Kälte auf seine Lebensfähigkeit. Berl. klin. Wochenschrift, num. 7, 1893. — (12) Karskinski. Archivio del Laboratorio di anatomia patologica dell' università di Varsavia, 1893. Citato da Kasanski. — (13) Wnukow. L' azione delle basse temperature sul vibrione del colera. Wratsch 1893. Recensione nel Centralblatt f. Bakter. und Parasiten. num. 23, 1893.— (14) Abel. Fortschrifte der Medizin, num. 10, 1893. — (15) Renk. Ueber das Verhalten der Cholerabacillen in Eise. Recensione nel Centralbl. f. Bakter. und Parasitenk., num. 6, 1893.— (16) Kasanski. Ueber das Einfluss der Kätte auf die Cholerabakterien von Koch und ähnliche Vibrionen von Finkler, Prior, Miller, Doneke und die Vibrionen Metschnikow. Centralbl. f. Bakter. und Parasitenk., num. 516, 1895.— (17) Maefadyen. On the influence of the temperature of liquid air on Bacterie. The Lancet, 1900. — (18) Billings. Sanitary Engineer 1887. Citato da Prudden. — (19) Bashenow. Ueber den Einfluss verschiedener Agentien auf Thyphusbacillen von Ebert-Koch. Klinische Wochenschrift, num. 3 6, 1888.— (20) Montefusco. Contributo alla biologia del bacillo del tifo. La Riforma Medica, 1893. — (21) Janowski. Centralbl. f. Bakt. und Parasitenk., num. 15, 1887. — (22) Park. A few experiments upon the effect of low temperatures and freezing of typhoid bacilli. Journ. of the Boston Soc. med. Scienc., vol. 4, num. 8. --- (23) Sadgwick e Winslow. Experimentelle und statistische Studien über den Einfluss der Kälte auf den Typhusbacillus und seine Verteilung. Recensione nel Centralbl. f. Bakter. und Parasitenkran., num. 18-19, 1900. — (24) Brehme. Ueber die Widerstandsfähigkeit der Choleravibrionen und typhusbacillen gegen niederen Temperaturen. Archiv f. Hygiene, vol. 40, 1901. --- (25) Gibier. Citato nella chimica biologica del Duclaux. V. Macè Batteriologia.